

**A koleszterinben gazdag „lipidutajak” szabályozó hatásai  
a limfociták effektor funkciói, differenciálódása és  
kommunikációja során**

Doktori értekezés tézisei

**Izsépi Emese**

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola Immunológia Program

Témavezető: **Dr. Matkó János**

Programvezető: **Prof. Dr. Erdei Anna**

ELTE TTK Immunológia Tanszék

Budapest, 2012



## BEVEZETÉS

A sejtek plazma membránjának kb. 40%-át alkotó, glikolipidben, szfingomielinben és koleszterinben gazdag lipidutajtok (raftok) egy rendezett struktúrát képeznek a rendezetlen plazma membránban, ezzel egy stabil platformot biztosítva a sejben zajló jelátviteli folyamatoknak.

A CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> sejtek aktiválásának, valamint más sejtekkel való együttműködésének feltételei és az általuk közvetített effektorfunkciók alapvetően befolyásolják az immunválasz mennyiségi és minőségi jellemzőit. A jelátviteli útvoalak kezdeti „upstream” eseményei legtöbb esetben a plazma membránhoz kapcsolódnak valamilyen formában, így ezen sejtek Th1 ill. Th2 irányú polarizációjának szabályozásában is kritikus szerepe lehet a lipid raftoknak.

A természetben minden egészséges szervezetben előfordulnak IgM és IgG típusú természetes koleszterin ellenes ellenanyagok (ACHA), a termelődsük körülményei, valamint fiziológias szerepük azonban máig ismeretlen. Megemelkedett szérum ACHA koncentrációt dektáltnak pl. számos atherosclerosis, érrendszeri betegség és HIV-1 fertőzés esetében, ezért fontos mikródsük és immunológiai folyamatokban való esetleges szerepük ismerete.

A sejtek közötti kommunikáció egy új keletű, lehetséges megnyilvánulási formája a membrán nanocső. Mivel a lipid raftoknak számos esszenciális szerep tulajdonítható a sejtben belüli jelátviteli folyamatok szabályozásában, így esetleg szerepük lehet a nanocsöveken keresztüli, sejtek közötti intercelluláris folyamatok szabályozásában is.

3. **2nd European Congress of Immunology (ECI), 2009 September, Berlin, Germany**  
Th cell polarization: studies on the molecular background in a murine model system  
*Izsepi E, Balogh A, Himmer L, Halda P, Panyi G, Laszlo G, Marko J*
4. **International PhD Day, 2010 June, Budapest, Hungary**  
Izsepi Emese: New aspects of neuro-immune communication: effect of depression and thymic vagus innervation on the T cell homeostasis
5. **Hungarian Society of Immunology XXXIX. Congress, 2010 September, Szeged, Hungary**  
New aspects of neuro-immune communication: effect of depression and parasympathic innervation on the T cell homeostasis  
*Izsepi E, Baracska P, Solymos E, Brecka N, Csirko A, Juhász G, Marko J*
6. **16<sup>th</sup> Symposium on „Immune-related Pathologies: Understanding Leucocyte Signaling and Emerging therapies”, 2011 September, Visegrád, Hungary**  
Structure and biological activity of monoclonal IgG3 anti-cholesterol antibodies  
*Balogh A, Izsepi E, Molnar A, Cervenak L, Flis G, János G, Mócsar G, Laszlo G, Marko J*
7. **12<sup>th</sup> International Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 2011 September, Strasbourg, France**  
B cells can communicate through membrane nanotubes: Imaging studies on the background of a tunnel formation mystery  
*Izsepi E, Csala A, Marko J*

## A disszertáció alapját képező publikációk:

1. *Eszpi E, Balogh A, Farkas A, Molnar A, Solyom E, Tróti EA, Csepányi-Köni R, Matko J.* The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation. *Immunology Letters*, 2012. 143: 106–115. *Impact Factor: 2.511*
2. *Eszpi E, Himer L, Szilagyi O, Hajdu P, Panyi G, Laszlo G, Matko J.* Membrane microdomain patterns, calcium signaling and NFAT activation as an important axis in determining polarized Th cell function *Cytometry A*, 2012. (submitted) *Impact Factor: 3.753*

## Egyéb publikáció:

*Beck Z, Balogh A, Kis A, Eszpi E, Brócs A, László G, Cervenák L, Lilom K, Mészár G, Vámosi G, Füst G, Matko J.* New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their *in vitro* virus production. *Journal of Lipid Research*, 2010. 51: 286–296. *Impact factor: 6.115*

## Konferencia előadás/poszter prezentációk:

1. **14<sup>th</sup> Symposium on „Signals and Signal Processing in the Immune System”, 2007 September, Balatonszőlő, Hungary**  
Th cell polarization: studies on the molecular background in a murine model  
*Eszpi E, Balogh A, Himer L, Látos H, Hajdu P, Panyi G, László G, Matko J*
2. **15<sup>th</sup> Symposium on „Signals and Signal Processing in the Immune System”, 2009 September, Balatonszőlő, Hungary**  
The AC8 anti-cholesterol antibody modulates Th cell activation signaling through affecting antigen presentation/costimulation by APCs  
*Eszpi E, Balogh A, Solyom E, Matko J*

## CÉLKITÜZÉSEK

Figyembe véve a humán gének viszonylag csekély számát és ezzel párhuzamban pl. az immunrendszeri betegségek nagy diverzitását, valószínűleg sok esetben többféle fehérje kommunikációjának „elhangolódásához” kapcsolható az egyes zavarok megjelenése. Azaz, valószínűleg a lényegi elem az immunrendszer sejtjének felületében az, legyenek. Ebben pedig, véleményünk szerint, alapvető fontossági a kritikus fehérjék membrán mikrodomének (raft, caveola) által kompartmentalizációja.

1. Mindezeket alapul véve egyik fontos célunk a Th sejt polarizáció molekuláris hátterének vizsgálata volt. A Th0, Th1 és Th2 alpopulációk esetében az antigénreceptor stimulációjára adott sejtválasz egyes elemeinek (pl. kalcium válasz, NFAT aktiváció) működése és a sejtmembrán megváltozott tulajdonságait (raft lipid és fehérje expresszió; ioncsatorna expresszió, funkció és kompartmentalizáció) közötti összefüggéseket kívántuk feltárni. Emellett, mivel az aktuális Th1/Th2 arányban ez is szerepet játszik, a polarizált Th sejt alpopulációk apoptózis érzékenységeinek összehasonlító analízisét is el kívántuk végezni egy új eredetű differenciált Th hibridoma sejtvonalakon. Célunk alapvetően tehát a helper T sejtek polarizált effektor funkcióinak hátterében rejlő, elsősorban a plazmamembránhoz kapcsolódó molekuláris hátter feltárása volt.

2. Vizsgálni kívánunk továbbá a munkacsoport által korábban előállított, a klszteres membrán koleszterinhez (raflokhoz) szelektíven kötődő, anti-koleszterin ellenanyag (AC8 ACHA) antigen-függetlő T sejt aktivációt moduláló hatásait az antigen felvétel, prezentáció és T sejt aktiváció szintjén (egér eredetű immunszinapszis sejtjes modellrendszerben).

3. Végül célkitűzésünk között szerepelt a limfociták között kialakuló nanoső hálózati formálódásnak és meghatározó körülményeinek tanulmányozása T és B limfocitákon, valamint az azt szabályozó mechanizmusok, faktorok feltárása.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- áramlási citometria fehérjék expressziójának, ellenanyagok kötődésének, sejtek  $Ca^{2+}$ -válaszának vizsgálatára
- ELISA módszer a sejtek citokin termelésének analizálására
- konfokális mikroszkópiás képalkotás fehérjék expressziójának, sejtek fagocitózisának és nanoső képződésének tanulmányozására
- Patch clamp technika az tonszatomákon keresztül áram detektálására és karakterizálására

ellenmond a  $Ca^{2+}$ - mérés eredményeinek. Mivel az tonszotoma immunológiai szinapszisba történő toborzása lipid raft függő, a polarizált sejtek különböző membrán szerveződése magyarázhatja ezt az ellenmondásos eredményt. Továbbá a polarizált Th sejtek különböző lipid raft és GPI-horgonyzott járulékos molekulákat (CD48, CD59) expresszálhatnak, valamint a naív sejtekből az effektor T sejtjékké differenciálódás során szignifikánsan megnő a plazma membrán gangliozid szintje. A polarizált sejtek apoptózis érzékenységet vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a Th1 sejtek érzékenyebbek az AICD-re. Az eredményekből jól látszik, hogy a különböző mikrodomén mintázat/összetétel, az aktivációs folyamatokban kulcsfontosságú molekulák különböző membrán kompartmentalizációja befolyásolja a Th sejt polarizáció kimenetelét.

A munkacsoport által korábban létrehozott, a klszteresedett koleszterinhez kötődő IgG3 típusú AC8 anti-koleszterin ellenanyag szabályozó szerepét vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy az ellenanyag képes pozitívan befolyásolni a makrofágok fagocitózist, továbbá a T sejtek felé irányuló antigen prezentációt. Az IgG3 típusú anti-koleszterin ellenanyagok immunszejtekre kifejtett szabályozó szerepének hátterében álló mechanizmusok megismerése hasznos lehet a vírusfertőzéseket és a sejtjes immunválaszt célzó új terápiás konstrukciók kidolgozásában.

Végül, de nem utolsón sorban a limfociták nanoső képződésének körülményeit vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy a membrán lipid rafloknak itt is kulcsfontosságú szerepe van. A raflok integritásának a megléte, valamint a gangliozid feloldulások a nanosővek kiindulási pontjaiban arra utalnak, hogy a lipid utajok aktívan részt vesznek a nanoső képzésben, esetleg molekulák nanosőveken keresztüli transzportjában.

aktív (B1AB) Burkitt limfóma sejtek nem, vagy csak kis mértékben képeztek nanocsöveket.

- A membrán lipid raflok integritását MBCD-val és a kortikális aktin citoskeleton integritását Latrunculin B-vel, vagy Cytochalasin D-vel megbontva lecsökkent a nanocső képződés gyakorisága a B sejtek között. Ezzel szemben a membrán fluidizálása linsolsavval fokozta a B sejtek nanocső képződését.
- Az LPS-sel aktivált B sejtek több és elágazóbb nanocsöveket képeztek, mint a nyugvó sejtek. Egér  $\gamma$  T sejtek aktiválása következében hosszú kötszerű nanocsöveket figyeltünk meg, melyek mentén a sejtek fluóreszertén csoportosultak.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A Th sejt polarizáció egy komplex, citokin környezetől függő, többlépcsős folyamat, melynek hátterében álló molekuláris mechanizmusok nem ismertek teljes mértékben. A Th1 sejtekben azonos aktivációs szignál hatására nagyobb amplitúdójú és kitartóbb  $\text{Ca}^{2+}$ -választ és hosszabb ideig tartó NFAT1 magi lokalizációt figyeltünk meg, ami eredményezheti a polarizált Th sejtek citokin termelésében mutatkozó különbségeket. Ennek egyik oka lehet a polarizált Th1 és Th2 sejtek különböző membrán szerveződése. A Kv1.3 feszültségfüggő ioncsatornát vizsgálva, ami hozzájárul a kitartott  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz kialakulásához, azt tapasztaltuk, hogy a Th2 sejteknél a csatornán keresztüli ionok áramlásútsége nagyobb, mint a Th1 sejteknél. Ez

## EREDMÉNYEK

### 1. A polarizált Th sejt választás hátterében álló mechanizmusok

- Az alkalmazott Th0, Th1 és Th2 egér hibridomákat aktiváció indukált INF $\gamma$  és IL4 citokin termelésük és géneexpressziós profiljuk alapján választottunk ki a már korábban előállított sejt vonalak közül. A vizsgálatokat ezen sejteken végeztük el.
- Kvantitatívan vizsgáltuk az anti-CD3 indukált kalcium jelet a három Th effektor sejt vonalon áramlási citométer és egy korábban kifejlesztett analízis szoftver [Kaposi, Cytoquery A, 2008] segítségével. A korábbi adatokkal összhangban a Th1 sejtekben magasabb és kitartóbb kalcium választ tapasztaltunk, mint a Th2 és Th0 sejtekben.
- Az NFAT1 transzkripciós faktor magba történő transzlokációjának vizsgálatakor, habár egy kismértékű koncentrációfüggés megfigyelhető volt a Th1 és Th2 sejtekben, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a három Th sejt között. Ezzel szemben az NFAT1 tartózkodási ideje a Th2 sejtekben a sejt magban sokkal rövidebb volt, mint a Th0 és Th1 sejtek esetében. Továbbá a lipid raflokat stabilizáló kolesterin kivonása a membránból 10 mM MBCD-vel nagymértékben csökkentette az NFAT1 sejt magba történő transzlokációját mindhárom Th alpopulációnál.
- A Th sejtek Kv1.3 ioncsatornát vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy a csatorna aktiváció kinetikája a Th1 sejtekben szignifikánsan lassabb (nagyobb  $\tau_d$ ), mint a Th0 és Th2 sejtekben. Valamint a Th2 sejtek

ionocitosinak drámsűrűsége (ami arányos az egységnyi membrán területre eső Kv1.3 csatornák számával) nagyobb, mint a másik két sejté.

- Az aktivált Th alpopulációk mindegyikében a TCR/CD3 raft lokalizációja nagyobb volt, mint a nyugvó sejtekben. A Th2 sejtekben a TCR/CD3 raft asszociációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Th1 sejtekben. Továbbá, míg a Th1 és Th0 effektor sejtekben a TCR-közvetített aktiváció a T sejt receptor polarizált sejtfelszíni eloszlását eredményezte, addig a Th2 sejtekben ez a fajta árendeződés nem volt megfigyelhető.
- A T sejt lipid raftok fő komponenseinek (GM1, koleszterin, CD3, CD4, CD48, CD59) expresszióját vizsgálva a polarizált sejtekben, azt tapasztaltuk, hogy a Th1 és Th2 sejtekben az egyes receptorok expressziós mintázata különbözött. A kísérletet az egér hibridoma sejteken és primer lepből izolált T sejteken is elvégeztük.
- A három Th hibridoma aktiváció indukált sejtjelhalál érzékenységet vizsgálva a Th1 sejtekben az apoptózis mértéke minden esetben nagyobb volt, mint a Th2 és Th0 sejtekben. A prekursor Th0 sejt aktiváció indukált sejtjelhalál érzékenysége bizonyult a legkisebb mértékűnek, egy fajta rezisztenciát mutatnak.

## 2. A monoklonális AC8 anti-koleszterin ellenanyag antigén-függő T sejt aktivációt moduláló hatása

- A monoklonális AC8 IgG3 anti-koleszterin ellenanyag kötődött az egér antigén prezentáló sejt (P388.D1) makrofágok, csontvelői eredetű egér

5

dendrítus sejtek, 2PK3 B sejt) felszínéhez, szemben az AC9 IgM ellenanyaggal.

- A makrofágok és dendritikus sejték raft-függő antigén felvételét az AC8 ellenanyag különböző módon befolyásolta. A P388.D1 makrofágok élesztő fagocitózisát fokozta, míg a DC-k OVA-immunkomplex felvételét nem befolyásolta az AC8 ellenanyaggal történő előkezelés.
  - Az AC8 ellenanyag B sejtekhez kötődve megváltoztatta az MHC-II és CD80 kostimulátor molekulák, valamint a lipid raftok sejtfelszíni eloszlását.
  - A B sejték előkezelése AC8 ellenanyaggal fokozta a  $Ca^{2+}$ -választ, valamint az NFAT1 magba történő transzlokációját ezen APC-k által aktivált T sejtekben. Ezzel szemben a szinapszis gyakoriságra, Erk foszforilációra és CD69 expresszió nem volt hatással az AC8 előkezelés.
- ### 3. A nanocsövek képződésének molekuláris háttere a limfocitákban
- A T (Jurkat) és B (A20) limfociták spontán képzettek nanocsöveket fiziológias körülmények között (fibronectin coat, 37°C).
  - A nanocső képződés függ a B sejték differenciáltsági/éresi állapotától. Az érett B sejték (A20) igen, míg az éretlen (38C13), az inaktív (BL41) és

6